



Figur 1. Dynamisk laboratoriemodel for lipolysen under fedtfordøjelsen i tarmen: Modellen omfatter et termostatstyret reaktionskammer, en computerkontrolleret pH-stat med en automatiseret burette for tilsætning af natriumhydroxid samt en burette til kontinuert, kontrolleret tilsætning af calciumchlorid. Alle forsøg udføres under omrøring. Foto: Lægemiddelforskning 2007.

Dynamisk model for fordøjelse af lipidbaserede lægemidler i tarmen

Lægemiddelstoffer skal opløses i tarmsaften, før de kan optages over tarmvæggen og komme ud i blodet og hen til virkningsstedet, men mange lægemiddelstoffer er tungtopløselige i vand. En mulig løsning på dette problem er at administrere lægemiddelstoffet i en lipidbaseret formulering. En ny model efterligner fordøjelsen af lipidbaserede lægemidler i mave-tarmkanalen

Af Anne Larsen, Dimitri Fatouros, Jette Jacobsen og Anette Müllertz, Institut for Farmaci og Analytisk Kemi, Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet.

At indtage medicin via munden i form af tabletter eller kapsler er velkendt og bekvemt i sammenligning med for eksempel en injektion. Lægemiddelstoffet frigives fra lægemidlet i mave-tarmkanalen og går i opløsning. Det er en forudsætning for optagelsen at stoffet går i opløsning. Mange nyopdagede lægemiddelstoffer er imidlertid tungtopløselige i vand, så her

er traditionelle tabletter problematiske. Inden for farmacie er det inden for de seneste år blevet almindeligt at klassificere lægemiddelstoffer efter deres vandopløselighed og deres evne til at passere tarmvæggen. Dette klassificeringssystem kaldes det biofarmaceutiske klassifikationssystem (BCS). I BCS er de forskellige lægemiddelstoffer inddelt i fire klasser (figur 2).

Permeabilitet ↑	Høj	Klasse II	Klasse I
	Lav	Klasse IV	Klasse III
		Lav	Høj
		Oploselighed →	

Figur 2. Det biofarmaceutiske klassifikationssystem (BCS). Kilde Amidon et al. 1995.

Et lægemiddelstof har en høj opløselighed hvis den højeste dosis kan opløses i 250 ml vand i pH intervallet 1-7,5. De 250 ml er baseret på, at tabletten/kapslen normalt skal indtages sammen med et glas vand af denne størrelse. pH området 1-7,5 afspejler det pH-interval, som stoffet udsættes for gennem mave-tarmkanalen. Høj og lav opløselighed er således et udtryk for om hele dosen kan opløses i den væskemængde, den tages sammen med. Det er vigtigt at lægemiddelstoffet kan opløses, da et stof skal være i opløsning for at det kan blive optaget over tarmvæggen og komme ud i blodet og hen til virkningsstedet. Den anden parameter i BCS er lægemiddelstoffets evne til at passere tarmvæggen. Denne evne betegnes stoffets permeabilitet og vurderes som høj eller lav. Ved høj permeabilitet passerer lægemiddelstoffet tarmvæggen hurtigt.

Mange af de nyopdagede lægemiddelstoffer tilhører klasse II i BCS, dvs. at de har en lav opløselighed og høj permeabilitet. Stoffer som har en lav opløselighed går som regel også langsomt i opløsning. Problemet med disse stoffer er ofte, at de ikke kan nå at opløses i løbet af den tid, de opholder sig i tarmen. Lægemiddelstoffet er således ikke tilgængeligt for at kunne passere tarmvæggen. Dette resulterer ofte i, at kun en lille del af dosen kommer ud i blodet og bliver tilgængeligt til at kunne udøve den ønskede effekt. I nogle tilfælde ses det, at fødeindtag øger mængden af lægemiddelstoffet, der kommer ind i blodet. Generelt er dette en effekt af, at føden stimulerer frigivelse af galde til tarmen. Galdesalte og komponenter fra føden kan øge lægemiddelstoffets opløselighed samt dets opløsningshastighed. Fødeindtaget kan også forlænge transittiden i mavesækken og derved øge den tid, som lægemiddelstoffet har til at gå i opløsning.

Nanoemulsion

Forskellige avancerede formuleringsprincipper kan øge opløseligheden af lægemiddelstoffer i tarmvæsken og derved forbedre optagelsen af stofferne til blodet. Et princip, der nyder stigende popularitet, er lipidbaserede formuleringer af typen selvemulgerende drug delivery-systemer (SEDSS). Disse formuleringer holder lægemiddelstoffet opløst i mave-tarmsafterne, hvorved man undgår opløsningstrinnet, som er det hastighedsbegrænsende trin i optagelsen af BCS klasse II lægemiddelstoffer. SEDSS formuleres som et prækoncentrat bestående af en olie, et overfladeaktivt stof og et co-solvent. Prækoncentratet, som indeholder lægemiddelstoffet, kan doseres i en kapsel. Når der tilsættes væske til prækoncentratet, vil der ved let omrystning spontant dannes en emulsion. Hvis der dannes en mikroemulsion, vil væsken være klar og let grålig eller blålig, og hvis der dannes større emulsionsdråber, vil væsken blive mælket. I en mikroemulsion er emulsionsdråberne ofte i nanostørrelse, som regel under 100 nanometer i diameter, hvorfor betegnelsen nanoemulsion også kan anvendes.

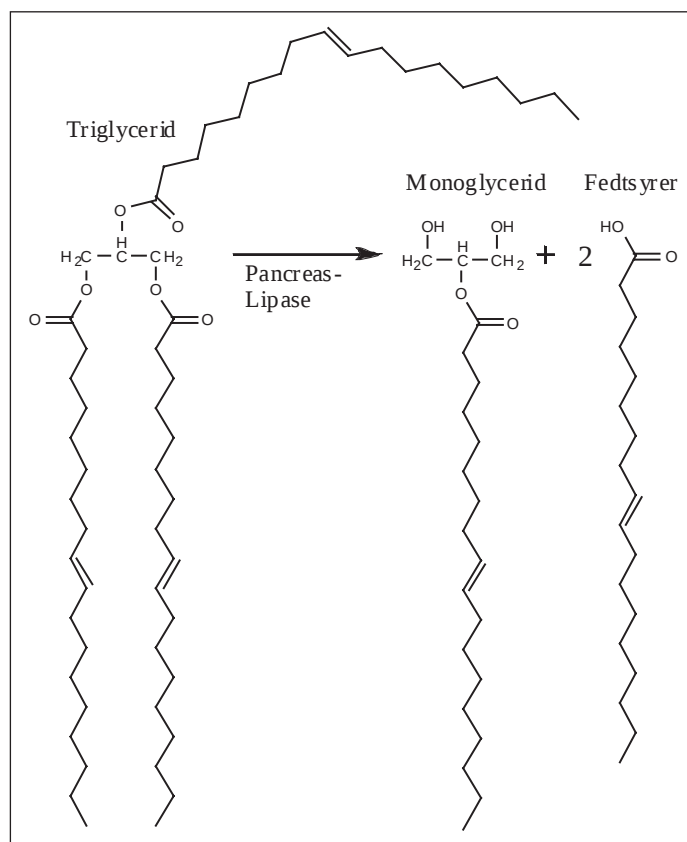
Når der skal udvikles en ny oral formulering for et givent lægemiddelstof, er det en fordel at have en test i laboratoriet,

som kan efterligne forholdene i menneskets tarm. Ved udvikling af tabletter anvendes typisk en udløsningstest, der måler, hvor hurtigt et lægemiddelstof frigives fra en formulering og går i opløsning. Denne test kan ikke anvendes for lipidbaserede formuleringer, fordi lægemiddelstoffet allerede er i opløsning fra starten.

Derfor har vi udviklet en lipolysemodel, der efterligner fedtfordøjelsen i tarmsystemet og dermed simulerer fordøjelsen af SEDSS i tarmen. Under fedtfordøjelsen dannes der forskellige faser; en lipidfase, en fast fase og en vandfase. Vandfasen indeholder kolloide strukturer som vesikler og miceller. Det er interessant at undersøge, hvilke faser lægemiddelstoffet fordeles til under lipolysen. Til det formål kan der anvendes biofysiske karakteriseringsmetoder for at få et overblik over, hvilke egenskaber de dannede faser fra forskellige formuleringer har.

Model for fedtfordøjelsen

Fedtfordøjelsen i mave-tarmkanalen er en dynamisk proces. Fedtet i føden er primært triglycerider. Fordøjelsen af triglycerider starter allerede i maven, hvor triglycerider hydrolyseres af gastriske lipaser til diglycerider og frie fedtsyrer. Det er dog kun en del af triglyceriderne, der bliver omdannet til diglycerider i maven. Indholdet fra maven tømmes gradvist over i tarmen, hvor føden blandes med galde og forskellige enzymer fra bugspytkirtlen (pancreas). Galden indeholder galdesalte, som emulgerer di- og tri-glyceriderne til en grov emulsion. Pancreas lipasen arbejder på overfladen af emulsionsdråberne og hydrolyserer di- og tri-glyceriderne til monoglycerider og frie fedtsyrer (figur 3).



Figur 3. Lipolyse af triglycerid af pancreas lipase. Pancreas lipasen lipolyserer triglycerider til monoglycerider og fedtsyrer.

Der dannes multilaminare flydende krystallinske faser – bestående af produkterne fra lipolysen, fedtsyrer og monoglycerider på overfladen af emulsionsdråberne. Under tilstedeværelsen af overfladeaktive galdesalte afsnøres faserne derpå til multilaminare vesikler og derefter til små miceller. Ligesom triglyce-

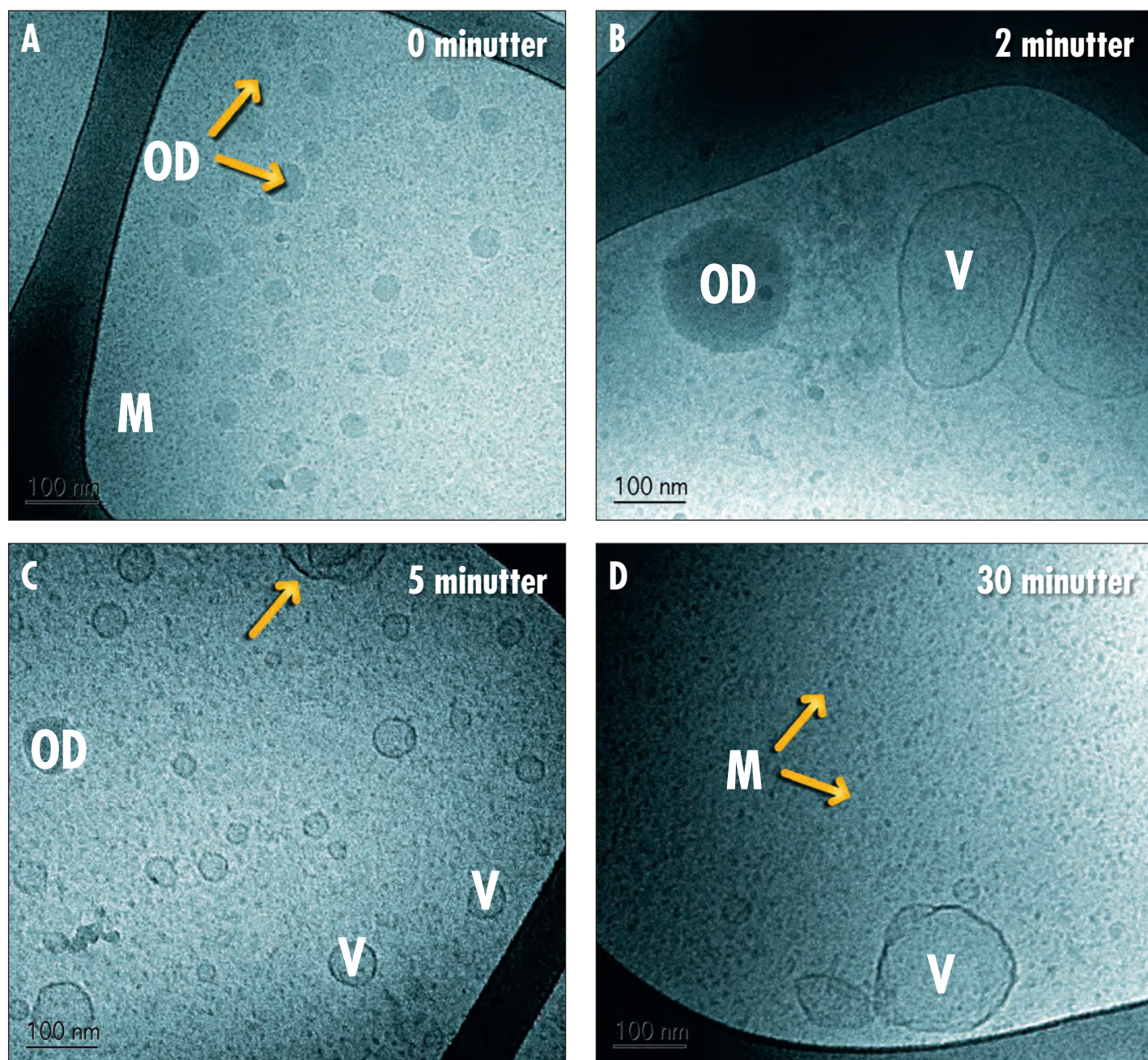
ridet i føden fordøjes, så fordøjes triglycerider fra lipidbaserede lægemidler også i mave-tarmkanalen. Andre komponenter fra lipidbaserede formuleringer kan også hydrolyseres i mave-tarmkanalen. For eksempel kan overfladeaktive stoffer, som indeholder esterbindinger, i nogle tilfælde hydrolyseres af de lipaser, der er i tarmen.

For at undersøge, hvilken skæbne nanoemulsioner med lægemiddelstoffer får i mave-tarmkanalen, har vi udviklet en lipolysemodel til at bruge i forbindelse med udvikling af lipidbaserede lægemiddelformuleringer. Lipolysemodellen efterligner fordøjelsen af fedt i tarmen og derved også fordøjelsen af lipidbaserede formuleringer.

Lipolysen foregår under forhold, der simulerer forholdene i den øvre del af tarmkanalen. Selve lipolysen foregår under tilstedeværelse af galdesalte, phospholipider og buffer ved pH 6,5. Temperaturen holdes konstant på 37°C under forsøget. Den

lipidbaserede formulering tilsættes, og herefter startes lipolysen ved tilsætning af et enzymekstrakt, der indeholder enzymer fra bugspytkirtlen. Samtidigt med at enzymekstraktet tilsættes startes også en kontinuert tilsætning af calciumchlorid. Calcium-ioner er en nødvendighed for aktiviteten af lipasen, calcium-ioner binder frie fedtsyrer, der ellers kan forhindre lipasen i at binde sig til fedtdråberne. Hastigheden af lipolysen kan styres ved at ændre på calciumtilsætningen.

Selve lipolysen følges ved brug af pH-stat titrering med natriumhydroxid. pH-stat titreringen har til formål at holde pH konstant på 6,5. Lipasen spalter triglyceriderne i den lipidbaserede formulering til frie fedtsyrer og monoglycerider. De frie fedtsyrer sænker pH og udløser derved en proportional mængde natriumhydroxid fra titratoren. Forbruget af natriumhydroxid til at holde pH konstant svarer til mængden af fedtsyrer, som bliver frigivet under lipolysen.



Figur 4. Cryo-TEM mikroskopibilleder: Simuleret fedtfordøjelse under faste af et selvemulgerende drug delivery system – en nanoemulsion indeholdende lægemiddelstof. a) Oliedråber (OD) i forskellige størrelser (se pile) og miceller (M) før starten af forsøget. b) Lipolyseprodukter 2 minutter efter tilsætning af lipase. Her ses store, aflange unilammellare vesikler (V) og oliedråber. c) Lipolyseprodukter 5 minutter efter tilsætning af lipase. De dominerende produkter er unilammellare, kuglerunde vesikler samt en bilamellar vesikel (se pil). d) Lipolyseprodukter 30 minutter efter tilsætning af lipase. Der er kun få unilammellare vesikler tilbage i mediet; de fleste er blevet omdannet til miceller (se pile).

Der kan løbende tages prøver ud fra modellen. Prøverne tilsættes en lipasehæmmer for at stoppe lipolysen. Prøverne bliver herefter centrifugeret ved meget høj hastighed (ultracentrifugeret). Ultracentrifugeringen medfører adskillelse i tre fraktioner: Bundfald, der primært består af calciumsæber af fedtsyrer og udfældet lægemiddelstof; en midterfraktion, der består af miceller og vesikler, og en øvre fraktion, der består af ikke-hydrolyserede fedtstoffer. Den generelle opfattelse er, at jo højere koncentration af lægemiddelstof der kan opnås i midterfraktionen med miceller og vesikler, des mere lægemiddelstof vil der være tilgængeligt for optagelse i tarmen.

Fordøjelse af lipidbaserede formuleringer

På nuværende tidspunkt findes der ikke særlig mange publice-rede forsøg, der undersøger lipolysen af lipidbaserede formuleringer og anvender den som en udviklingsparameter, hvilket primært skyldes, at modellen endnu ikke er særligt udbredt. Det er imidlertid vist, at modellen er effektiv i undersøgelser af, hvordan lægemiddelstoffer opløses, og hvilke kolloide faser der dannes.

For nylig har vi publiceret undersøgelser af morfologiske og strukturelle ændringer, der sker under fordøjelse af SEDDS, som danner nanoemulsioner under forhold, som efterligner tarmsystemet under faste. Ved forsøgene blev prøver udtaget på forskellige tidspunkter under lipolysen. Disse prøver er så efterfølgende blevet undersøgt ved Cryogen Transmissions Elektron Mikroskopi (Cryo-TEM). Ved Cryo-TEM nedfryses prøven meget hurtigt til meget lave temperaturer. Denne teknik gør det muligt at se meget små strukturer i prøven – helt ned til 20 nanometer.

Forsøgene viste (figur 4), at der er miceller tilstede under hele lipolyseprocessen. Oliedråber fra formuleringen omdannes til runde eller aflange unilamellare vesikler, efterhånden som lipolysen skrider frem. Et lille antal bilamellare vesikler kan også ses. Efter 50 procents lipolyse ses et fald i antallet af vesikler og oliedråber, og der er primært miceller tilstede. Dette studie viser, hvilke strukturer der dannes ved lipolyse af et selv-emulgerende drug delivery system. Dannelsen af de forskellige strukturer vil have betydning for, hvor meget lægemiddelstof der kan opløses og være tilgængeligt for optagelse. Denne slags studier er vigtige for at opnå en større forståelse for, hvordan optimale lipidbaserede formuleringer kan fremstilles, blandt andet hvordan sammensætningen af formuleringen kan have indflydelse på, hvilke strukturer der dannes ved lipolysen.

Med det stigende antal tungtopløselige lægemiddelstoffer, som udvikles i den farmaceutiske industri, stiger anvendelses-potentialet for lipidbaserede formuleringer. Derfor øges behovet for udvikling af laboratoriemodeller, som kan efterligne forholdene i mave-tarmkanalen, og som derved kan anvendes som et værktøj i forbindelse med en strategisk udvikling af lipidbaserede lægemidler.

E-mail-adresser:

Anne Larsen: al@farma.ku.dk

Anette Müllertz: amu@farma.ku.dk

Kilder:

Om det biofarmaceutiske klassifikationssystem:

Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res 12:413-420.

Om lipidbaserede lægemidler:

Hauss DJ (editor). 2007. Oral Lipid-Based Formulations: Enhancing the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs. Informa Healthcare.

Om lipolyse af lipidbaserede lægemidler:

Fatouros DG, Bergenstahl B, Müllertz A. 2007. Morphological observations on a lipid-based drug delivery system during in vitro digestion. Eur J Pharm Sci 31:85-94

Thorvalds Madkort



Le poulet aux 40 gousses d'ail

Dans une cocotte à couvercle et aliant au four; mettez un grand verre d'huile d'olive, un gros bouquet de thym et de romarin et 40 gousses d'ail en chemise. Deposez sur ce lit le poulet dont l'intérieur aura été salé et poivré, et arrosez d'huile d'olive. Couvrez la cocotte hermétiquement avec son couvercle et mettez à cuire au four moyen pendant environ une heure et demie.

Kylling med 40 fed hvidløg

Hæld et glas olivenolie i et ildfast fad med tilhørende låg, tilsæt et stort bundt timian og rosmarin samt 40 fed upillede hvidløg. Kyllingen krydres indvendigt med salt og peber, samt med lidt olivenolie. Anbring kyllingen ovenpå hvidløg etc. i fadet. Læg låget på og anbring fadet i en 175° varm ovn og lad det stå der i 1½ time.

Nu ville jeg anrette kyllingen med brød og en god rødvin. Hvidløgene kan man sidde og hygge sig med at tage ud af »chemisen« og spise til mens brødet dypes i olien. Alternativt kunne man blende hvidløgene med olien til en jævn sauce, der nok skal smages til med salt og peber.

Lidt om hvad hvidløg kan og gør

40 fed hvidløg lyder jo drabeligt, men de bliver virkelig tæmmet under tilberedningen.

Den svovlforbindelse som det drejer sig om og som flyder rundt i cellesaften på det rå hvidløg hedder *Alliin*. Det er et stof (S-allylcysteinsulfoxid), der er et derivat af den svovlholdige aminosyre cystein. Dens navn er afledt af løgfamilien latinske navn *Allium*. Et enzym i cellernes vacuoler kaldes *Alliinase*. Når *alliin* møder *allinase* – som når man knuser et fed hvidløg – så kommer der et ustabil molekyle *Allicin* ud af det. Ustabiliteten kommer til udtryk ved, at *allicin* mister et iltatom og efterlader *diallyldisulfid*, som er det der lugter/stinker. Det som bider på tungen er et mellemproduktet på vejen frem mod *Allicin* (*allylsulfensyre*). Ved opvarmningen denaturerer enzymet, løget har nu en ganske mild smag.